

**Análisis genético y molecular de los genes
DEN29, DEN30, VEN1 y VEN3
de *Arabidopsis thaliana***

Trabajo realizado por la Licenciada Almudena Mollá Morales, en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar a la Suficiencia investigadora.

Elche, 18 de septiembre de 2007.

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

PEDRO ROBLES RAMOS, Profesor Titular de Escuela Universitaria de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Almudena Mollá Morales para optar a la Suficiencia investigadora. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Pedro Robles Ramos

Elche, 18 de septiembre de 2007.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Como parte del proceso de disección genética del desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana* que se está llevando a cabo en el laboratorio de J.L. Micol, el objetivo principal de mi Tesis es el análisis genético y molecular de los genes *DEN29*, *DEN30*, *VEN1* y *VEN3*.

El análisis de ligamiento a marcadores polimórficos de *den29* nos ha permitido delimitar un intervalo candidato que contiene 75 presuntos genes, flanqueado por los marcadores PLS2 ($1,90 \pm 0,54$ cM) y CER460157 ($0,17 \pm 0,17$ cM) del cromosoma 2. Los análisis morfométricos que hemos realizado demuestran que el tamaño de las hojas y de la roseta es menor que el de su ancestro silvestre *Ler* 21 días después de la siembra. A esta edad las células del mesófilo en empalizada de *den29* son más grandes que las silvestres y los espacios intercelulares más irregulares y de mayor tamaño. El mutante *den29* florece más tarde que el silvestre y produce más hojas vegetativas, y tanto el porte de su inflorescencia principal como el número de inflorescencias secundarias y silicuas se encuentran incrementados.

Hemos determinado que el mutante *den30* es portador de una delección de 30.033 pb en el cromosoma 4, desde el segundo exón del gen At4g31920 (*ARR10*) hasta el tercer intrón de At4g32000, eliminando completamente 8 unidades de transcripción y parcialmente a otras dos. Aunque *den29* y *den30* comparten algunos rasgos fenotípicos, un tamaño de hoja reducido, floración tardía y un aumento del porte y número de silicuas, su severidad es menor en *den30*. Por el contrario, el mesófilo en empalizada del mutante *den30* está mucho más desorganizado que el de *den29*, y presenta espacios intercelulares mucho más grandes. En la epidermis adaxial de las hojas de *den30* aparecen células pavimentosas gigantes que no se observan en su ancestro silvestre ni en *den29*. La búsqueda de alelos insercionales en los genes del intervalo delecionado en *den30* no nos ha permitido establecer por el momento cuáles son los genes responsables del fenotipo mutante.

Hemos clonado posicionalmente el gen *VEN1*, estableciendo que la mutación *ven1-1* radica en el octavo exón del gen At5g05730, que codifica la subunidad α de la antranilato sintasa (*ASA1*), una enzima clave en la ruta de biosíntesis del triptófano (Niyogi y Fink, 1992).

Hemos definido un intervalo candidato (63 kb; 17 presuntos genes) a contener el gen *VEN3*, flanqueado por los marcadores SGCSNP9916 y CER479988 del cromosoma 1. Hemos utilizado una adaptación de la técnica denominada TILLING

(McCallum *et al.*, 2000; Colbert *et al.*, 2001; Till *et al.*, 2003) que nos ha permitido identificar en el alelo *ven3-4* una mutación de cambio de sentido en la secuencia codificante del gen At1g29780, cuya función se desconoce. No hemos encontrado mutación alguna en la unidad de transcripción de At1g29780 de los restantes alelos *ven3*, por lo que vamos a caracterizar sus regiones intergénicas adyacentes.